

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 6日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650438

研究課題名（和文） 廃用性萎縮に対する低周波鍼通電療法の効果

研究課題名（英文） The efficacy of the low frequency electrical acupuncture to the disuse muscle atrophy

研究代表者

福林 徹 (FUKUBAYASHI TORU)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号：70114626

研究成果の概要（和文）：骨格筋萎縮抑制のメカニズム解明のため、後肢懸垂型と不活動型筋萎縮モデルマウスを用いて筋萎縮を引き起こす標的遺伝子の mRNA の発現量を定量化した所、骨格筋分解酵素 E3 ユビキチンリガーゼ atrogin-1, MuRF1 などの発現量は、鍼治療によって有意に減少した。また、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、マトリックスメタロプロテアーゼや CCL21 などの第二次リンパ組織ケモカインが鍼治療に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of preventing skeletal muscle atrophy, we adopted the skeletal muscle atrophy models with the hind limb suspension or the novel spiral wire immobilization. By acupuncture interventions, we found that acupuncture treatments improved the expression levels of target genes such as Atrogin-1 and MuRF1 of E3 ubiquitin ligases. Furthermore, cDNA microarray analysis clarified new candidate genes involved in acupuncture treatment to prevent skeletal muscle atrophy, including CCL21 and matrix metal proteinases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学／応用健康科学

キーワード：廃用性筋萎縮，後肢懸垂，鍼通電療法，Atrogin-1, MuRF1

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では日々の健康状態に留意し、骨格筋の萎縮予防に適切な対処法を行う必要がある。骨格筋は可塑性に富むゆえに、適度な運動や栄養の改善などを行うことによって筋力維持は可能である。しかし、実際には寝たきりや転倒・骨折などによるギプス固定を強いられ、廃用性筋萎縮を引き起こす症例は少なくない。高齢者や怪我をした患

者では、運動療法や食事療法によらない補完的治療法が求められることも多い。鍼治療は東洋医学を代表する代替療法の一つであるが、その作用機序は科学的に証明されてきたとは言いがたく、分子生物学的な解析はほとんどなされていない。鍼治療は臨床の現場において、筋血流の改善や筋疲労の回復などに用いられていることから、骨格筋疾患に対しても対処可能な治療法の一つである。これまでの先行

研究により骨格筋萎縮を引き起すメカニズムとして、サルコメアを特異的に分解する E3 ユビキチンリガーゼが骨格筋分解経路の中心的役割を果たしていることが報告されている。そこで本研究では、鍼治療が骨格筋萎縮を抑制するという仮説を立て、遺伝子発現動態を検証する実験プロトコールを設定し、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

東洋医学の代表的な治療法である鍼治療による骨格筋萎縮抑制効果を、分子生物学的手法を用いて検証することを目的とする。

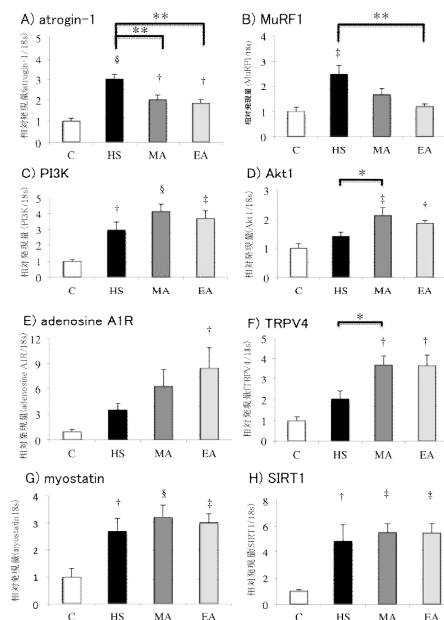
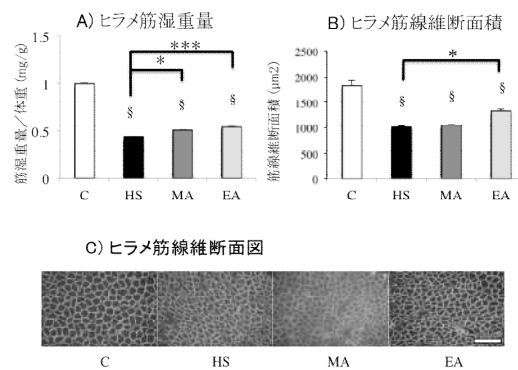
## 3. 研究の方法

後肢懸垂ならびに不活動型固定による骨格筋萎縮モデルマウス(C57BL6, 8週齢, 雄)を採用し、骨格筋萎縮を惹起させた下肢に、鍼治療による介入実験を行う。群分けは、対照群、後肢懸垂群、置鍼群、鍼通電群の4群とする(n=8/各群)。ペントバルビタール系麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下の鍼通電群に、直径0.12 mmのディスプレイ鍼を用いて、両肢腓腹筋遠位部2カ所に頻度1 Hz、強度6.5 mAの通電鍼刺激を1日30分間、2週間連続して施行する。置鍼群は鍼通電群と同様に1日30分間、鍼を腓腹筋中に置き、電気刺激は行わないこととする。2週間の介入実験後の筋湿重量、筋線維断面積、標的遺伝子の mRNA を RT-PCT を用いて定量化する。また、cDNA マイクロアレイを用いて、標的遺伝子の網羅的発現解析を行い、スクリーニングされた遺伝子の発現量を定量化する。

## 4. 研究成果

(1)後肢懸垂によって引き起こされたヒラメ筋筋湿重量は置鍼法によって有意に増加し(p<0.05)、鍼通電療法によって筋湿重量と筋線維断面積は有意に増加した(各 p<0.001, p<0.05)。反対に E3 ユビキチンリガーゼであ

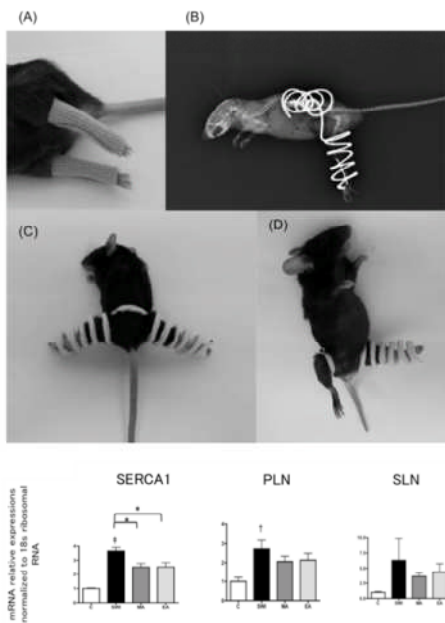
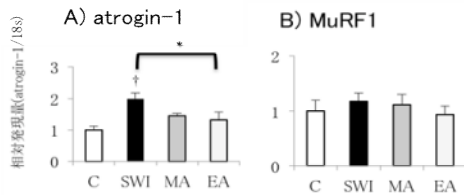
る atrogen-1 の mRNA 発現量は置鍼法ならびに鍼通電療法によって有意に減少した(各 p<0.01, p<0.001)。また、もう一つの E3 ユビキチンリガーゼである MuRF1 の発現量は鍼通電療法によって有意に減少した(p<0.05)。さらに置鍼法によって Akt1 や TRPV4 の mRNA 発現量が有意に上昇することが検証された(各 p<0.001, p<0.05)。これらの結果から、鍼治療による骨格筋萎縮抑制のメカニズムは、E3 ユビキチンリガーゼの発現量を減少させる機序が働く可能性が示唆された。



(2)螺旋ワイヤー固定法モデルという下肢の骨格筋萎縮を引き起こす新しいモデルを作成し、その効果を検証した。ヒラメ筋湿重量ならびに atrogen-1 の発現量を定量化した所、鍼治

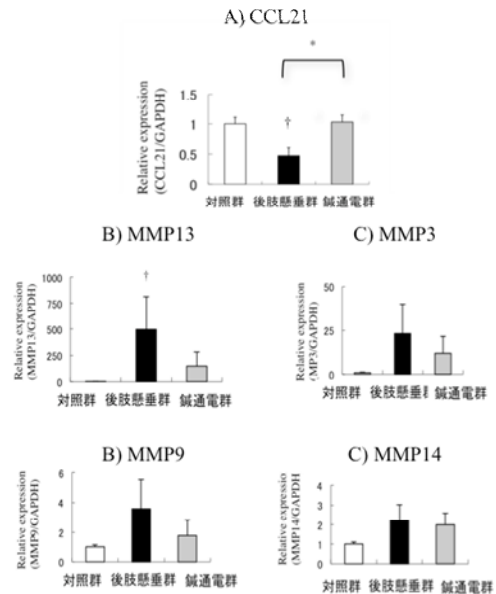
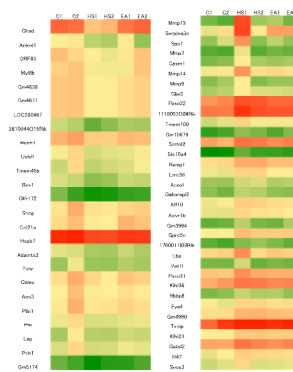
療によって有意に改善された (各  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ).

さらに、筋収縮能力の指標である、速筋型 SERCA (sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase) 1 の発現量が固定によって上昇し、鍼治療によって有意に減少していることから、鍼治療は、筋収縮能力に対しても影響を与える可能性が示唆される結果となった。 ( $p < 0.05$ ).



(3)後肢懸垂型筋萎縮モデルによって引き起こされたヒラメ筋のサンプルを採用し、cDNA マイクロアレイを用いて標的遺伝子の網羅的発現解析を行った所、マトリックスメタロプロテアーゼや CCL21 などの第二次リンパ組織ケモカインが抽出された。

cDNA マイクロアレイ Heat map



以上の研究結果から鍼治療は後肢懸垂型ならびに不活動型固定による筋萎縮の抑制に有効であり、そのメカニズムとして atrogen-1, MuRF1, MMPs, Akt1, TRPV4, CCL21 などの遺伝子の発現を変化させる機序が働く可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) 遠田明子, 櫻井敬晋, 福林徹. 骨格筋萎縮時の鍼刺激によるマウス体重/摂食量動態について. 東京有明医療大学雑誌. 3:20-25, 2013. (査読有)
- (2) Akiko Onda, Qibin Jiao, Yasuharu Nagano, Takayuki Akimoto, Toshikazu Miyamoto,

Susumu Minamisawa, Toru Fukubayashi:  
Acupuncture Ameliorated Skeletal  
Muscle Atrophy Induced by Hind limb  
Suspension in Mice. Biochemical and  
Biophysical Research Communication,  
410:434-439, 2011. (査読有)

- (3) 遠田明子, 宮本俊和, 福林徹: 廃用性萎縮  
モデルマウスに対する鍼通電療法の効果  
全日本鍼灸学会, 61(1): 68-76, 2011. (査  
読有)

[学会発表] (計7件)

- (1) Akiko Onda, Susumu Minamisawa, Toru  
Fukubayashi: Acupuncture treatment  
improved the skeletal muscle atrophy  
induced by spiral wire immobilization  
procedure in mice. Physiological  
Society of Japan, Tokyo, 27 Mar 2013.
- (2) Akiko Onda, Yoichiro Kusakari, Susumu  
Minamisawa, Toru Fukubayashi: Skeletal  
muscle atrophy induced by a spiral wire  
immobilization procedure was improved  
by electroacupuncture in mice.  
Orthopaedic Research Society, San  
Antonio, 26 Jan 2013.
- (3) 遠田明子, 焦其彬, 南沢享, 福林徹: 固定  
型筋萎縮モデルマウスに対する鍼治療の  
効果. 臨床スポーツ医学会. 新横浜,  
2012, 11, 2
- (4) Qibin Jiao, Susumu Minamisawa, Toru  
Fukubayashi: Acupuncture ameliorated  
skeletal muscle atrophy induced by  
hindlimb suspension and spiral wire  
immobilization in mice. Experimental  
Biology. San Diego, 23 Apr 2012.
- (5) 遠田明子, 焦其彬, 福林徹, 南沢享: 鍼  
通電療法による筋萎縮抑制効果を導く標

的遺伝子の探索. 日本臨床分子医学会. 京  
都. 2012. 4. 11

- (6) Akiko Onda, Qibin Jiao, Susumu  
Minamisawa, Toru Fukubayashi. A novel  
spiral wire immobilization procedure  
induces hind limb muscle atrophy in  
mice. Physiological Society of Japan.  
Matsumoto, Japan. 28 Mar 2012.
- (7) Akiko Onda, Qibin Jiao, Yasuharu Nagano,  
Takayuki Akimoto, Toshikazu Miyamoto,  
Susumu Minamisawa, Toru Fukubayashi:  
Acupuncture Ameliorated Skeletal  
Muscle Atrophy Induced by Hind limb  
Suspension in Mice. Orthopaedic  
Research Society. San Francisco, 4 Feb  
2012.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福林 徹 (Toru Fukubayashi)  
早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授  
研究者番号: 70114626

### (2) 研究分担者

南沢 享 (Susumu Minamisawa)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
研究者番号: 40257332

### (3) 連携研究者

焦 其彬 (Qibin Jiao)  
早稲田大学・理工学術院・助手  
研究者番号: 20581127  
永野 康治 (Yasuharu Nagano)  
新潟医療福祉大学・健康科学部健康スポー  
ツ学科・講師  
研究者番号: 00548282